

BM

Method of binding a biological material

Patent Number: ☐ US6017698

Publication date: 2000-01-25

Inventor(s): FRITZ MICHAEL (DE); MACHO HEINZ (DE); GEISLER EDDA (DE); HARTTIG HERBERT (DE); SCHWAB JUERGEN (DE); BIENHAUS GERHARD (DE)

Applicant(s):: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (DE)

Requested Patent: ☐ EP0734768

Application Number: US19960617698 19960401

Priority Number (s): DE19952005652U 19950401; DE19951012360 19950401

IPC Classification: C12Q1/68 ; G01N21/00 ; G01N33/543 ; G01N33/548

EC Classification: B01L3/14, B01L3/14C, B65D39/16, B65D51/16C2, G01N1/34B

Equivalents: JP3096422B2, ☐ JP8278239, NO961270

Abstract

Subject matter of the invention is a method of binding a biological material to a solid phase by providing a sample liquid containing the biological material in a sample vessel (A) having an inner contour (A17); then a hollow body (C) which has a contour (C12) that matches the inner contour (A17) is introduced into the sample vessel (A) while being closed with respect to the sample vessel by means of a porous matrix (C11); the sample liquid can enter the structural form (C) through the porous matrix (C11). This method is easy to automate and reduces the generation of aerosols.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

07. Okt. 1996

Kopie

4623

11/11/Bm

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 734 768 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
02.10.1996 Patentblatt 1996/40

(51) Int. Cl.⁶: B01L 3/14, G01N 33/543

(21) Anmeldenummer: 96104920.2

(22) Anmeldetag: 28.03.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH DE ES FR GB IT LI NL

(30) Priorität: 01.04.1995 DE 29505652 U
01.04.1995 DE 19512360

(71) Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
68298 Mannheim (DE)

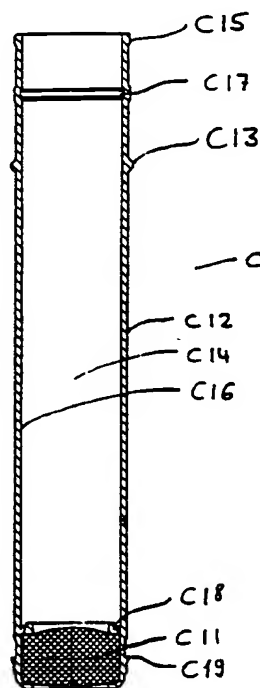
(72) Erfinder:
• Bienhaus, Gerhard, Dr.
82407 Wielenbach (DE)

- Fritz, Michael
68647 Biblis (DE)
- Schwab, Jürgen
68775 Ketsch (DE)
- Geisler, Edda
68199 Mannheim (DE)
- Harttig, Herbert, Dr.
67122 Altrip (DE)
- Macho, Heinz
64658 Fürth (DE)

(54) Verfahren zur Bindung eines biologischen Materials

(57) Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bindung eines biologischen Materials an eine Festphase durch Bereitstellung einer das biologische Material enthaltenden Probenflüssigkeit in einem Probengefäß (A) mit einer inneren Kontur (A17) und Einbringen eines gegen das Probengefäß mit einer porösen Matrix (C11) verschlossenen, eine auf die innere Kontur (A17) abgestimmte Kontur (C12) aufweisenden und hohlen Formkörpers (C) in das Probengefäß (A), so daß Probenflüssigkeit durch die poröse Matrix (C11) in den Formkörper (C) eindringt. Dieses Verfahren ist leicht automatisierbar und reduziert die Entstehung von Aersolen.

FIG. 1



EP 0 734 768 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bindung eines biologischen Materials an eine Festphase sowie ein hierfür geeigneter Formkörper, der eine poröse Matrix und Bauteile zur Verbindung mit weiteren Funktionsteilen aufweist.

In vielen Anwendungsgebieten erfordert die Behandlung von Flüssigkeiten besondere Sorgfalt im Hinblick auf eine aktive Vermeidung der Entstehung von Kontaminationen, die einen schädlichen Einfluß auf die Umgebung ausüben könnten. Dies gilt insbesondere für giftige Flüssigkeiten, jedoch auch für üblicherweise während Analysen von Inhaltsstoffen anfallende Flüssigkeiten. In der Regel werden nämlich Behandlungsschritte zur Vorbereitung einer Probenflüssigkeit für die Analyse in demselben Labor oder sogar Raum vorgenommen, wie die Analyse selbst. Zum Beispiel durch während der Behandlung entstehende Aerosole wird die Umgebung oft so stark z. B. mit Probenbestandteilen kontaminiert, daß die Analyse von Inhaltsstoffen anderer Proben dadurch verfälscht wird. Ein falsches Analyseergebnis kann insbesondere bei der Analyse von Inhaltsstoffen in der medizinischen bzw. klinischen Diagnostik für den Patienten schreckliche Folgen haben.

Analysen, die auf dem Nachweis von Nukleinsäuren in einer Probe beruhen, wurden in jüngerer Zeit wegen ihrer relativ hohen erreichbaren Spezifität als Diagnosehilfsmittel angeführt. Diese Tests stellen jedoch wegen des üblicherweise geringen Gehalts an Nukleinsäuren und insbesondere der nachzuweisenden Nukleinsäuren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nukleinsäuren ähnlicher Sequenz sowie anderer Inhaltsstoffe, die Nukleinsäurebestimmungen empfindlich stören können, eine erhebliche technische Herausforderung dar. Es hat sich herausgestellt, daß die in letzter Zeit immer populärer werdenden Amplifikationsverfahren, mit denen in einer Reaktion, abhängig von der Anwesenheit einer ganz bestimmten, nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz eine Vielzahl identischer Nukleinsäuren hergestellt werden können, die Empfindlichkeit der Tests wesentlich verbessern können, so daß manchmal sogar einzelne Nukleinsäuren nachgewiesen werden können. Die hohe erreichbare Empfindlichkeit der Nachweise hat jedoch auch zur Folge, daß Kontaminationen (Verunreinigungen) von anderen Proben mit selbst nur einer einzigen Nukleinsäure aus der Umgebung zu einem positiven Analyseergebnis führen kann und so ein positives Analyseergebnis vorgetäuscht wird. Aus diesem Grund muß für Nukleinsäuretests eine besonders effektive Vermeidung bereits der Entstehung von Kontaminationen, d. h. der Austritt von Nukleinsäuren aus einer Probe oder einem Reaktionsgemisch in die Umgebung, betrieben werden.

Bei der Vorbereitung von Proben zur Analyse von Inhaltsstoffen, insbesondere Nukleinsäuren, werden in jüngerer Zeit in vermehrtem Umfang Verfahren eingesetzt, bei denen die Probenflüssigkeit und darin enthaltene oder daraus isolierte Inhaltsstoffe in einem Gefäß einer Behandlung unterzogen werden, bei der eine Flüssigkeit durch eine Einlaßöffnung in das Gefäß eingebracht wird und die Flüssigkeit nach einem oder mehreren Behandlungsschritten durch eine Auslaßöffnung aus dem Gefäß entfernt wird. Solche Gefäße sind auf dem Markt in Form von Säulen erhältlich, die beispielsweise Materialien zur Abtrennung von Inhaltsstoffen aus der Flüssigkeit enthalten, wie der QIAamp Kit der Firma Qiagen. Diese Gefäße befinden sich in einem Gefäß, so daß eventuell austretende Flüssigkeit in dieses Gefäß austritt und nicht in die Umgebung. Diese Art der Behandlung von Flüssigkeiten ist jedoch aufwendig und benötigt ein entsprechendes zweites Gefäß. Darüber hinaus werden diese Gefäße in Zentrifugen eingesetzt, um die Flüssigkeit in das zweite Gefäß zu schleudern.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war, es die derzeit bekannten Verfahren zur Bindung eines biologischen Materials an eine Festphase im Hinblick auf im Stand der Technik bekannte Nachteile teilweise oder vollständig zu verbessern.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bindung eines biologischen Materials an eine Festphase durch Bereitstellung einer das biologische Material enthaltenden Probenflüssigkeit in einem Probengefäß mit einer inneren Kontur und Einbringen eines gegen das Probengefäß mit einer porösen Matrix verschlossenen, eine auf die innere Kontur abgestimmte äußere Kontur aufweisenden und hohlen Formkörper in das Probengefäß, so daß Probenflüssigkeit durch die poröse Matrix in den Formkörper eindringt.

Außerdem ist Gegenstand der Erfindung ein hohler Formkörper, enthaltend eine zur Bindung eines biologischen Materials fähige poröse Matrix und Bauelemente zur Befestigung eines Deckels und eines den Formkörper zumindest teilweise umfassenden Gefäßes.

Biologisches Material im Sinne der Erfindung kann jedes biologische Material sein. Insbesondere handelt es sich um Inhaltsstoffe von Proben, wie sie in der medizinischen bzw. klinischen Diagnostik oder in der Molekularbiologie vorkommen. Die Inhaltsstoffe sind entweder nieder- oder hochmolekulare Bestandteile. Niedermolekulare Bestandteile sind beispielsweise Haptene oder Antigene mit einem Molekulargewicht von weniger als 2.000 D. Hochmolekulare Bestandteile sind insbesondere Biopolymere, insbesondere solche, die aus Aminosäuren oder Nukleotidbausteinen aufgebaut sind. Insbesondere handelt es sich um immunologisch aktive Proteine, wie Antigene und Antikörper, und Nukleinsäuren. Besonders geeignet ist das vorliegende Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren.

Grundlage für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Bereitstellung einer das biologische Material enthaltenden Probenflüssigkeit. Diese ist bevorzugt in einem Probengefäß (A) enthalten, welches eine innere

In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Formkörper (C) mit Hilfe eines den Formkörper in Richtung auf die Umgebung aerosoldicht verschließenden Deckels in das Probengefäß (A) eingeführt. Durch aufeinander abgestimmte Konturen wird der Durchtritt der Probenflüssigkeit durch die poröse Matrix in den Innenraum des Formkörpers erzwungen. Hierbei wird das biologische Material an der porösen Matrix gebunden. Danach wird die im Hinblick auf das biologische Material abgereinigte Probenflüssigkeit aus dem Formkörper oder/und dem Probengefäß entfernt. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß die Restflüssigkeit durch die dem Probengefäß abgewandte Seite des Formkörpers entnommen, z. B. abpipettiert, wird. Bevorzugt ist jedoch, daß die Restflüssigkeit aus dem Probengefäß (A) entnommen (z. B. abgesaugt) wird und bei diesem Vorgang die in den Formkörper eingedrungene Restflüssigkeit durch die poröse Matrix in das Probengefäß dringt.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat besonders für solche biologischen Materialien besondere Vorteile, bei denen ein einmaliger Durchtritt durch die poröse Matrix noch nicht zur vollständigen Bindung der Gesamtmenge des biologischen Materials ausgereicht hat. Es ist nämlich mit der erfindungsgemäßen Konstruktion möglich, durch Zurückziehen des Formkörpers, z. B. in einen Teil des Probengefäßes, der nicht von Probenflüssigkeit angefüllt ist, und erneutes Einbringen in den mit Probenflüssigkeit gefüllten Teil des Probengefäßes, zwei nochmalige Durchtritte der Probenflüssigkeit durch die poröse Matrix zu erreichen. Dies kann die Ausbeute an immobilisiertem biologischem Material erhöhen.

Nach Entfernen der restlichen Probenflüssigkeit aus den Poren der Matrix kann, um eine eventuell erforderliche Entfernung weiterer zurückgebliebener Verunreinigungen zu erreichen, die Matrix mit einer Waschlösung behandelt werden. Dies kann erfindungsgemäß bevorzugt dann geschehen, wenn der Formkörper sich noch in dem Probengefäß befindet. Durch Wahl eines Deckels, welcher sowohl das Probengefäß als auch den Formkörper aerosoldicht verschließt, wird der Eintrag von kontaminierenden Aerosolen in den Formkörper reduziert. Um eine besonders zweckmäßige Behandlung des Formkörpers und des Probengefäßes zu erreichen, ist die Kraft zur Lösung des Deckels (B) vom Probengefäß (A) geringer als die Kraft zur Lösung des Deckels (B) von dem Formkörper (C). Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, daß der Anpreßdruck des Deckels auf die beiden Komponenten unterschiedlich stark ist. Der Anpreßdruck kann durch das Vorsehen von Rastelementen moduliert werden.

Darüber hinaus kann durch Vorsehen von Rastelementen an dem Formkörper (C) und dem Probengefäß (A) erreicht werden, daß der Deckel entfernt werden kann, ohne daß sich der Formkörper aus dem Probengefäß löst.

Sofern das biologische Material in an die poröse Matrix gebundener Form vorliegt, kann es entweder noch in dem Probengefäß (A) oder erst nach Entfernung des Formkörpers (C) aus dem Probengefäß (A) weiter bearbeitet werden. Unter einer Weiterbearbeitung wird insbesondere die Aufhebung der Bindung des biologischen Materials an die poröse Matrix verstanden. Es ist jedoch auch möglich, das biologische Material direkt in an die poröse Matrix gebundener Form nachzuweisen.

Zur Entfernung des Formkörpers (C) aus dem Probengefäß (A) wird bevorzugt ein weiterer, den Formkörper in Richtung auf die Umgebung aerosoldicht verschließender Deckel (B) benutzt, wobei die Kraft zur Lösung des Formkörpers (C) aus dem Probengefäß (A) geringer ist als die Kraft, mit der der Deckel den Formkörper (C) festhält. Der Formkörper kann daraufhin in ein Gefäß (D) eingebracht werden, wo er so befestigt ist, daß er bevorzugt nur unter Zerstörung des Formkörpers (C) oder des Gefäßes (D) oder mit einer Kraft, die größer ist als die Kraft, die zur Lösung des Deckels (B) vom Formkörper (C) erforderlich ist, aus dem Gefäß (D) entfernt werden kann. Im Gefäß (D) können die Reaktionen zur Aufhebung der Bindung des biologischen Materials durchgeführt werden.

Die Reihenfolge der beiden Schritte Bereitstellung der Probenflüssigkeit in dem Probengefäß (A) und des Einbringens eines Formkörpers in das Probengefäß ist prinzipiell vertauschbar. In einer ersten Möglichkeit kann zunächst der Formkörper in das Probengefäß eingebracht werden und daraufhin die Probenflüssigkeit eingefüllt werden. Dies kann sowohl in den Innenraum des Formkörpers als auch in das Probengefäß geschehen. Bevorzugt ist jedoch der Fall, daß die Probenflüssigkeit sich zunächst im Probengefäß befindet und anschließend der Formkörper in das Probengefäß eingeführt wird.

Gegenüber Verfahren, die auf einem Durchsaugen einer Probenflüssigkeit durch eine poröse Matrix, z. B. ein Säulenmaterial, oder auf Zentrifugation der Probenflüssigkeit durch eine poröse Matrix beruhen, hat das erfindungsgemäße Verfahren den Vorteil, daß deutlich weniger Aerosole gebildet werden und Zentrifugation und Absaugschritte sind außerdem recht komplexe Vorgänge. Die Automation der Arbeitsabläufe ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls besser möglich als mit den bekannten Verfahren. Die Möglichkeit, die Probenflüssigkeit mehrmals durch die poröse Matrix fließen zu lassen, stellt ebenfalls einen großen Verfahrensvorteil dar.

In Figur 1 ist ein erfindungsgemäßer Formkörper gezeigt. Es handelt sich hier um ein im wesentlichen hohlzylindrisches Gefäß, welches auf der einem Probengefäß zugewandten Seite eine poröse Matrix (C11) aufweist. Diese wird durch den Haltering (C18) und die Bördelkante im Formkörper fixiert. Darüber hinaus sind die umlaufenden Haltermittel (C15 und C13) zur Befestigung eines Deckels bzw. zur Befestigung des Formkörpers in einem Elutionsgefäß erkennbar. Bevorzugt enthält der Formkörper weiterhin Mittel zur Fixierung weiterer Mittel in seinem Inneren, z. B. eine Einrastkerbe (C17) für die Fixierung eines Stempels. Der Formkörper hat eine Außenkontur (C12) und eine Innenkontur (C16). Der Hohlraum im Inneren des Formkörpers ist mit C14 bezeichnet. Der Haltering (C18) ist hier in einer Form gezeigt, in der er von dem Formkörper durch Vorsehen von Sollbruchstellen entlang der inneren Kontur abbrechbar

Kontur (A17) aufweist. Diese innere Kontur ist bevorzugt glatt. Ein besonders bevorzugter Fall ist, daß das Probengefäß eine hohlzylindrische Innenform aufweist.

Die Probenflüssigkeit kann entweder in schon für die Bindung des biologischen Materials geeigneter Form in das Probengefäß eingegeben werden, sie kann jedoch auch das Ergebnis von Vorbereitungsschritten einer ursprünglichen Probenflüssigkeit sein. Beispielfhaft seien an dieser Stelle zwei alternative Möglichkeiten für die Bereitstellung von nukleinsäurehaltiges Material enthaltenden Probenflüssigkeiten beschrieben. In einer Ausführungsform wird eine ursprüngliche Probenflüssigkeit in einem Aufschlußgefäß zur Freisetzung von Nukleinsäuren aus dieser enthaltenden Zellen mittels eines die Zellwände lysierenden Reagenzes behandelt. Anschließend wird, gewünschtenfalls nach Abtrennung unerwünschter Probenbestandteile, die nukleinsäurehaltige Probenflüssigkeit in das Probengefäß (A) eingefüllt. In einer zweiten Ausführungsform, welche bevorzugt ist, wird die ursprüngliche Probenflüssigkeit in das Probengefäß eingefüllt und erst dann Reagenzien zur Freisetzung der Nukleinsäuren aus den Zellen zugegeben. Auch in diesem Fall liegen die Nukleinsäuren frei in der Probenflüssigkeit vor. Die Reaktionsschritte, die zu einer Bereitstellung des biologischen Materials führen, sind dem Fachmann aus der Fachliteratur bekannt.

Die das biologische Material enthaltende Probenflüssigkeit wird nun im Probengefäß (A) mit dem Formkörper (C) so in Kontakt gebracht, daß Probenflüssigkeit durch die poröse Matrix (C11) in den Formkörper (C) eindringt. Der Formkörper ist hohl, so daß die Probenflüssigkeit in ihn eindringen kann. Bevorzugt hat der Formkörper eine hohlzylindrische Form, wobei das auf das Probengefäß hindeutende Ende durch die poröse Matrix verschlossen ist und das vom Probengefäß wegdeutende Ende Bauelemente zur Befestigung eines Deckels aufweist. Die äußere Form des Formkörpers ist auf die innere Form des Probengefäßes so abgestimmt, daß der Formkörper in das Probengefäß eingebracht werden kann. Bevorzugt liegt die äußere Kontur des Formkörpers eng an der inneren Kontur des Probengefäßes an, so daß der Formkörper sich wie ein im Probengefäß bewegender Kolben verhält.

Die Matrix (C11) ist porös, so daß die Probenflüssigkeit durch sie hindurchdringen kann. Hierdurch ist es möglich, die poröse Matrix wie einen Filter zu verwenden, um das Eindringen unerwünschter Probenbestandteile in den Formkörper (C) zu vermeiden. Bei den unerwünschten Bestandteilen kann es sich beispielsweise um partikuläre Bestandteile handeln, z. B. Reste von Zellwänden, die bei einer vorangegangenen Lyse der Zellen nicht zerstört wurden, jedoch auch Magnetpartikel, die zur Immobilisierung der Zellen verwendet worden sind. In diesem Fall findet beim Durchtritt der Probenflüssigkeit durch die poröse Matrix eine Abreicherung der Probenflüssigkeit an diesen Bestandteilen statt. Das biologische Material kann in diesem Fall in der Probenflüssigkeit verbleiben. In einer zweiten Funktion kann die poröse Matrix selbst schon zur Bindung des biologischen Materials verwendet werden. Hierzu wird eine Matrix gewählt, die eine Affinität zu dem zu bindenden biologischen Material aufweist. Es ist sowohl eine unspezifische als auch eine spezifische Bindung möglich, je nach gewählter Oberfläche der Matrix. Enthält die Matrix an ihrer Oberfläche beispielsweise Antikörper, so können während des Durchtritts der Probenflüssigkeit durch die Matrix Antigene, gegen die der Antikörper gerichtet ist, an der Matrix gebunden (immobilisiert) werden. Für die Bindung von immunologisch aktiven Stoffen hat sich als poröse Matrix insbesondere Cellulose, z. B. Papier, als günstig erwiesen. Eine Immobilisierung von Nukleinsäuren ist beispielsweise dadurch möglich, daß als Matrix ein Glasfaservlies (sequenzunspezifische Immobilisierung) oder ein poröses Material, an dem eine Nukleinsäure, welche zu der zu bindenden Nukleinsäure komplementär ist, gebunden ist (sequenzspezifische Immobilisierung), verwendet wird.

Bei der porösen Matrix kann es sich um vliesartige Matrices handeln, aber auch um partikuläre Matrices, wenn diese wiederum, z. B. durch Filter, so im Formkörper lokalisiert sind, daß die Probenflüssigkeit Gelegenheit hat, in die Poren der partikulären Matrix einzudringen. Im bevorzugten Fall handelt es sich bei der porösen Matrix um eine vliesförmige Matrix. Es kann sich auch um eine aus mehreren Komponenten (z. B. unterschiedlich festen Vliesen) handeln. Die Porosität der Matrix bewirkt ein langsames Durchströmen der Matrix durch die Flüssigkeit, so daß eine Reaktion, z. B. Binding von Inhaltsstoffen der Flüssigkeit an die Matrix, besonders effektiv ist.

Diese Matrix kann auf bekannte Weise in dem Formkörper befestigt werden. Beispielsweise kann sie von der dem Probengefäß abgewandten Seite des Formkörpers in den Formkörper eingefügt und, z. B. mit Hilfe eines Halterings, an der vorbestimmten Position fixiert werden. Für eine weitere Befestigung der Matrix kann diese zusätzlich in dem Formkörper eingeschweißt werden. Bevorzugt wird die Matrix jedoch von der dem Probengefäß zugewandten Seite in den Formkörper eingebracht, bevorzugt bis zu einem vorinstallierten Haltering entlang der Innenwand des Formkörpers und anschließend der überstehende Rand so nach innen umgebördelt, daß die Matrix zwischen Haltering und Bördelkante fixiert ist.

Besonders bevorzugt wird die Matrix auf der dem Probengefäß abgewandten Seite durch einen ringförmig umlaufenden Vorsprung in der inneren Kontur des Formkörpers festgehalten. Ganz besonders bevorzugt ist dieser Vorsprung in der Materialstärke so gewählt, daß er ohne Zerstörung der Matrix und des übrigen Formkörpers abgebrochen werden kann.

Die poröse Matrix ist außerdem besonders bevorzugt komprimierbar. Unter komprimierbar wird im Sinne der Erfindung eine Matrix verstanden, aus welcher bei Ausüben eines Druckes durch Aufdrücken eines stempelförmigen Gerätes sich das äußere Volumen der Matrix verkleinert und darüber hinaus sich die Porengröße verringert, so daß ursprünglich in der Matrix enthaltene Flüssigkeit aus der Matrix herausgedrückt wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gestaltet ist. Bei der Matrix (C11) handelt es sich bevorzugt um ein komprimierbares Material, welches mit Hilfe eines in den Formkörper eingeführten Stempels (E) zusammengedrückt werden kann. Die Fixierung der Matrix in komprimierter Form geschieht bevorzugt durch Fixierung des Stempels (E) über geeignete Vorsprünge auf der Außenkontur und Einrasten in die Einkerbung (C17). Der umlaufende Rand (C19) kann als Dichtlippe gegenüber der Innenkontur eines Elutionsgefäßes (D) verwendet werden. Hierdurch wird verhindert, daß eventuell vorgelegte Elutionsflüssigkeit in größerem Umfang zwischen die Außenkontur (C12) des Formkörpers und die Innenkontur des Elutionsgefäßes gerät. Dieselbe Funktion kann die Dichtlippe auch für den möglichst vollständigen Durchtritt der Probenflüssigkeit durch die poröse Matrix (C11) im Hinblick auf die Innenkontur des Probengefäßes (A) erfüllen.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens für die Aufarbeitung nukleinsäurehaltiger Probenlösungen, werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt (siehe FIG 2). In einem ersten Schritt (I) wird eine zellhaltige Probenflüssigkeit in einem Probengefäß (A) mit einem Material inkubiert, an welches die Zellen gebunden werden, aus denen Nukleinsäuren gewonnen werden sollen. Hierzu kann dieses Material entweder spezifische Bindeeigenschaften für die Oberfläche der Zellen aufweisen, z. B. durch Immobilisierung von Antikörpern gegen Oberflächenantigene oder ein Absorbermaterial (A16, nicht gezeigt), es kann jedoch auch ein Material mit Filtereigenschaften (A15, nicht gezeigt) vorgesehen sein, durch welches die Zellen zurückgehalten werden, wenn die Flüssigkeit durch das Material durchtritt, z. B. aus dem Probengefäß entfernt wird. Bedingungen für die Immobilisierung von Zellen an Oberflächen sind dem Fachmann bekannt, z. B. aus *Methods in Enzymology* Vol. 171, *Biomembranes / Part R Transport Theory: Cell and Model Membranes*, Edited by Sidney Fleischer, Becca Fleischer, Department of Molecular Biology, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee.

Während der Inkubation ist das Probengefäß bevorzugt durch einen Deckel (B) verschlossen, um aktiven bzw. passiven Kontaminationsschutz zu gewährleisten.

In einem weiteren Schritt wird die Flüssigkeit aus dem Probengefäß entfernt, während Zellen, deren Nukleinsäuren isoliert werden sollen, in an das Material gebundenem Zustand im Probengefäß zurückbleiben. Sofern es sich bei dem zellbindenden Material um partikuläre Materialien handelt, kann ein Zurückhalten auch dadurch erreicht werden, daß das Material magnetisch ist und ein Magnetfeld von außen an das Probengefäß angelegt wird, welches so stark ist, daß das partikuläre Material im Probengefäß zurückbleibt, wenn die Flüssigkeit entfernt wird. Das Entfernen der Flüssigkeit kann auf verschiedenste Weise geschehen. Beispielsweise kann die Flüssigkeit durch eine räumlich von der Einlaßöffnung (A10) getrennte Auslaßöffnung (A11) entfernt werden. Sofern die Auslaßöffnung im unteren Teil des Probengefäßes und unterhalb der zurückgehaltenen Zellen gelegen ist, kann die Flüssigkeit, z. B. unter Anlegen eines leichten Vakuums, abgesaugt werden. Hierzu kann beispielsweise an der Auslaßöffnung ein Ventil vorgesehen sein, welches sich durch Anlegen von Unterdruck öffnet.

Zur weitergehenden Entfernung eventuell störender Probenbestandteile von den Zellen können ein oder mehrere Waschschritte vorgesehen werden. Hierzu wird in das Probengefäß eine Waschflüssigkeit eingefüllt, in der sich eventuelle Verunreinigungen lösen, die jedoch die Bindung der Zellen an die Oberfläche des zellbindenden Materials nicht wesentlich beeinträchtigen. Solche Waschlösungen sind dem Fachmann z. B. aus den Zellseparationsprotokollen bzw. aus entsprechenden Reinigungskitsprotokollen für Nukleinsäuren bekannt. Sie richten sich im wesentlichen nach der Art der Bindung der Zellen an das Material.

Nachdem gegebenenfalls die letzte Waschlösung aus dem Probengefäß (A) entfernt wurde, werden die gereinigten, angereicherten Zellen mit einer geeigneten Lyseflüssigkeit zur Freisetzung der Nukleinsäuren aus den Zellen in Kontakt gebracht. Die Reagenzien dieser Lyseflüssigkeit richten sich weitgehend nach der Art der immobilisierten Zellen. Sofern es sich bei den Zellen um Bakterien handelt, enthält die Lyseflüssigkeit bevorzugt Proteinase K zum Abbau der Zellwand. Gewünschtenfalls wird die Lyse durch Erhitzen bzw. Abkühlen sowie Mischen der Reaktionsmischung unterstützt. Sofern es sich bei dem zellbindenden Material um magnetische Partikel handelt, kann die Mischung auch mittels Magneten vorgenommen werden. Außerdem ist eine Mischung durch Schütteln des Probengefäßes möglich. Am Ende dieses Aufschlusses liegen die zu isolierenden Nukleinsäuren frei in der Lösung vor.

Auch während der Lyse ist das Reaktionsgefäß bevorzugt durch einen Deckel verschlossen, um Kontaminationen aus der Umgebung zu verhindern. Nach Ende der Lyse wird der Deckel, bevorzugt mit Hilfe einer entsprechenden mechanischen Vorrichtung, entfernt. Danach wird in das Probengefäß, welches eine Mischung von Abbauprodukten der Zellen sowie die Nukleinsäuren enthält, ein Formkörper (C) eingeführt, dessen äußere Kontur (C12) auf die innere Kontur (A17) des Probengefäßes abgestimmt ist. Dieser Formkörper ist hohl und in Richtung auf das Probengefäß und die Reaktionsmischung hin durch einen Filter (C11) verschlossen. Die Einführung des Formkörpers (C) erfolgt bevorzugt mit Hilfe eines Bauelementes (B11) des Deckels (B), der außerdem ein Bauelement (B10) enthält, welches zum Verschluß des Probengefäßes geeignet ist. In diesem Fall wird der Formkörper mit dem Deckel ergriffen (II) und gleichzeitig mit dem Verschluß des Probengefäßes in das Probengefäß eingeführt. Während dieses Vorgangs wird außerdem die Reaktionsmischung durch den Filter (C11) in den Hohlraum (C14) des Formkörpers eindringen (IV). Durch das Vorsehen des Filters können einerseits große Partikel an dem Eintritt in den Hohlraum gehindert werden und andererseits kann, wenn der Filter nukleinsäurebindende Eigenschaften hat, schon während des Durchtritts der Reaktionsmischung eine Bindung der Nukleinsäuren an den Filter erreicht werden. In diesem Fall ist es zweckmäßig, ein glasfaserhaltiges Filtermaterial zu wählen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In einem nächsten Schritt wird die verbleibende Lysereaktionsmischung aus der durch A und C gebildeten Vorrichtung entfernt, z. B. durch Absaugen durch eine untenliegende Auslaßöffnung (A11) im Probengefäß. Auch die in den Hohlkörper (C14) des Formkörpers eingedrungene Lösung wird somit entfernt, so daß der Filter möglichst keine Flüssigkeitsreste mehr enthält. Danach wird der bisher verwendete Deckel (B) entfernt, wobei der Formkörper (C) zunächst im Probengefäß verbleibt (eingerastet) (V).

Gleichzeitig oder anschließend wird ein Elutionsgefäß (D) zur Aufnahme des Formkörpers (C) vorbereitet. Ein gegebenenfalls auf diesem Gefäß befindlicher Deckel wird entfernt (VI). Bevorzugt wird vor Überführung des Formkörpers (C) in das Elutionsgefäß (D) eine Elutionslösung in das Elutionsgefäß vorgelegt, z. B. einpipettiert. Die Zusammensetzung der Elutionslösung richtet sich nach der Art der Bindung der Nukleinsäuren an das Material im Filter (C). Sie enthält Reagenzien, unter deren Einwirkung die immobilisierten Nukleinsäuren von dem Material eluiert, d. h. gelöst, werden. Der ursprünglich das Elutionsgefäß verschließende Deckel (B) wird auf das Probengefäß (A) mit dem Formkörper (C) aufgesteckt (VII).

Zur Entnahme des Formkörpers (C) aus dem Probengefäß (A) wird der Formkörper (C) mit dem Deckel (B) entfernt (VIII). Die Kombination aus Deckel und Formkörper wird anschließend in das Elutionsgefäß eingeführt (IX). Bevorzugt enthält der Formkörper (C) Mittel (C13, nicht gezeigt) zur Fixierung des Formkörpers im Elutionsgefäß (D), die bewirken, daß der Formkörper nur unter Zerstörung des Formkörpers (C) oder des Gefäßes (D) oder mit einer Kraft, die größer ist als die Kraft die zur Lösung des Deckels (B) vom Formkörper (C) erforderlich ist, aus dem Gefäß (D) entfernt werden kann. Eine Entfernung des Formkörpers aus dem Elutionsgefäß ist nicht beabsichtigt.

Während des Eindringens des Formkörpers (C) in das Elutionsgefäß dringt die vorgelegte Elutionslösung in den Filter (C11) und die löst die immobilisierte Nukleinsäure von der festen Matrix ab. Je nach Menge der vorgelegten Elutionslösung wird entweder nur der Filter mit der Elutionslösung getränkt oder dringt die Elutionslösung mit den wieder gelösten Nukleinsäuren in den Hohlkörper (C14) ein. Damit die Elution der Nukleinsäuren möglichst vollständig verläuft, sollte die Innenkontur des Elutionsgefäßes möglichst dicht an die Außenkontur des Formkörpers angepaßt sein.

In einem folgenden Schritt wird der Deckel (B) von der Kombination aus Formkörper (C) und Elutionsgefäß (D) entfernt (X). Er wird benutzt, um einen Stempel (E) aufzunehmen (XI) und in den Hohlraum des Formkörpers (C) einzuführen (XII). Dieser Deckel greift von innen in den Stempel (E). Der Stempel wird so kräftig gegen den Filter (C11) gepreßt, daß Flüssigkeit aus dem Filter durch eine in der Andrucksfläche befindliche Öffnung in einen Innenraum des Stempels eindringt. Dieser Vorgang ist besonders effektiv, wenn die Andrucksfläche in ihrer äußeren Kontur zumindest in dem Bereich, in dem die Auspressung stattfinden soll, an die innere Kontur des Formkörpers (C) angepaßt ist. Der Stempel (E) kann bevorzugt in dieser Lage, z. B. durch Einrasten, fixiert werden. Da die so gebildete Vorrichtung durch den Deckel relativ gut verschlossen ist, kann die nukleinsäurehaltige Lösung in der Vorrichtung aufbewahrt werden.

Zur Entnahme einer gewünschten Menge an Nukleinsäurelösung kann der Deckel entfernt (XIII) und über eine Öffnung des Innenraums des Stempels die gewünschte Menge entnommen, z. B. in einem Pipettivorgang (XIV). Anschließend kann der Deckel wieder aufgesetzt werden.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein hohler Formkörper enthaltend eine zur Bindung eines biologischen Materials fähige poröse Matrix (C11) und Bauelemente (C12, C13) zur Befestigung eines Deckels und eines den Formkörper zumindest teilweise umfassenden Gefäßes (D). Die Bauelemente (C12 und C13) stellen vorzugsweise Rastelemente dar, die das Handling des Formkörpers erhöhen und das Zusammenspiel der einzelnen verwendeten Module erleichtern.

Der erfindungsgemäße Formkörper kann auf einfache Weise durch spritzgußtechnische Verfahren hergestellt werden. Der Grundkörper besteht hierzu bevorzugt aus Kunststoff wie beispielsweise die Kunststoffe vom Polypropylen-Typ.

In Figur 1 ist ein erfindungsgemäßer Formkörper im Längsschnitt gezeigt.

In Figur 2 ist ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren gezeigt, welches das erfindungsgemäße Verfahren zur

Bindung eines biologischen Materials an eine Festphase beinhaltet.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Der beispielhafte erfindungsgemäße Formkörper ist ein zylinderförmiges Kunststoff-Röhrchen (Außendurchmesser = 6,75 mm, Innendurchmesser = 6,0 mm, Höhe = 40,4 mm, Novolen 1100 UCX, hergestellt durch Spritzguß), dessen obere Einlaßöffnungs-Außenwandung eine Einrastlippe (C15) aufweist zur reversiblen Kopplung eines Deckels mit dem Formkörper. Eine weitere Einrastlippe (C13) befindet sich ca. 6 mm unterhalb der ersten Einrastlippe. Sie wird für die irreversible Fixierung des Formkörpers im Elutionsgefäß (D) benötigt. An der oberen Einlaßöffnung-Innenwandung befindet sich eine Einrastkerbe (C17) zur irreversiblen Fixierung eines Auspreßstempels E im Innenraum des Formkörpers.

Die Auslaßöffnung (= Röhrchen-Boden) wird mit einem Glasfaservlies (Durchmesser = 7,0 mm, Höhe 1,5 bis 3,0 mm) verschlossen.

Die Glasvlies-Matrix wird 2mal mit 500 µl Waschpuffer gereinigt. Die über der Matrix stehende Pufferlösung wird durch das Glasvlies abgesaugt. Anschließend wird die Matrix mit der gereinigten Nukleinsäure bei 50°C/3 min getrocknet. Der Probengefäß-Deckel (B) wird verworfen.

Der Formkörper (C) mit der Nukleinsäure wird mittels Elutionsgefäß-Deckel (E) von dem Probengefäß (D) in einen vorbereiteten Elutionspuffer mit 200 µl Elutionspuffer überführt. Der Elutionspuffer löst die Nukleinsäure von der Glasvlies-Matrix ab. Die Nukleinsäure-Lösung steht teilweise über der Matrix.

Die Matrix im Formkörper wird in einem weiteren Schritt durch das Einführen des Auspreßstempel-Formkörper (F) mit dem Elutionsgefäß-Deckel (E) komprimiert, um das Totvolumen der Nukleinsäure-Lösung zu minimieren.

Nukleinsäure-Ausbeuten

Die Versuche wurden mit zwei verschiedenen Nukleinsäureprobe-Konzentrationen durchgeführt. Folgende Ergebnisse konnten ermittelt werden:

Versuchsreihe 1: Probenkonzentration: 6 µg Nukleinsäure/200µl Elutionslösung

Versuchs-Nummer	isolierte gebundene Nukleinsäure(µg)	Ausbeute (%)
Versuch 1	1,4 µg	22,9
Versuch 2	1,6 µg	27,5
Versuch 3	1,2 µg	23,8
Versuch 4	1,5 µg	29,8
Versuch 5	1,6 µg	35,2

Versuchsreihe 2: Probenkonzentration: 20 µg Nukleinsäure/200 µl Elutionslösung

Versuchs-Nummer	isolierte gebundene Nukleinsäure (µg)	Ausbeute (%)
Versuch 1	3,7 µg	28,0
Versuch 2	6,4µg	38,8
Versuch 3	4,8 µg	40,0
Versuch 4	4,1 µg	30,3
Versuch 5	5,1 µg	37,8

Bezugszeichenliste

- A** Probengefäß
- 10** Einlaßöffnung
- 11** Auslaßöffnung
- 17** innere Form
- 19** Außenform
- 22** Element zur Fixierung von weiteren Funktionselementen
- B** Deckel

Das Glasfaservlies wird nach oben über einen, an drei Stellen mit der Innenwandung des Tubes verbundenen abreißbaren Ring (C18) und von unten über eine Bördelkante fixiert. Zur Minimierung des Totvolumens ist der abreißbare, umlaufende Ring vorteilhaft. Er erfüllt folgende Anforderungen: obere Fixierung der ein oder zwei Lagen Glasfaservlies; beim Auspressen des Glasfaservlieses mit dem Auspreßdevice soll er abreißen und somit den Zwischenraum minimieren. An der äußeren Fläche befinden sich Dichtungslippen (C19), welche das Abdichten zwischen Formkörper und Probengefäß (A) bzw. Elutionsgefäß (D) übernehmen.

Beispiel 2:

Biologische Materialien / Chemikalien / Devices

Probenmaterial:	Längenstandard II, Fa. Boehringer Mannheim
Bindungspuffer:	Qiagen AL 1 / AL 2 (4 Teile / 1 Teil), Fa. Qiagen
Waschpuffer:	Qiagen AW-Puffer, Fa. Qiagen
Elutionspuffer:	10 mM Tris-Puffer pH 9,0

Probengefäß (A)
 Probengefäß-Deckel (B)
 Formkörper (C) mit einer porösen Matrix aus Glasvlies (C11)
 Elutionsgefäß (D)
 Elutionsgefäß-Deckel (E)
 Auspreßstempel-Formkörper (F)

Ansatz der Probenlösungen

Probe:	200 µl (6 µl Längenstandard II in PBS-Puffer gelöst)
Proteinase K:	25 µl
Bindungspuffer:	200 µl (AL 1 und AL 2-Puffer in Verhältnis 4+1 gemischt)
Ethanol:	210 µl
Gesamtvolumen pro Ansatz	635 µl

Durchführung des Beispiels

Probengefäß (A) wird mit 200 µl Probe, 25 µl Proteinase K-Lösung und 200 µl Bindungspuffer gefüllt. Das Probengefäß (A) wird mit dem Probengefäß-Deckel (B) verschlossen. Die Flüssigkeiten werden im geschlossenen Gefäß gemischt. Danach erfolgt die Inkubation bei 70°C/10 min (Aufschluß der Zellen) mit anschließender Abkühlungsphase auf 20°C in 3 min. Das Probengefäß (A) wird geöffnet und es erfolgt eine Zugabe von 210 µl Ethanol. Das Probengefäß (A) wird verschlossen und die Lösung gemischt.

Das Probengefäß (A) wird geöffnet. Der Probengefäß-Deckel (B) holt den Formkörper (C) mit einer porösen Matrix aus der Vorlage. Der Formkörper mit der Glasvlies-Matrix wird durch die Eingangsöffnung in das mit Flüssigkeit gefüllte Probengefäß eingebracht. Die im Probengefäß (A) vorhandene Flüssigkeit durchströmt von unten das Glasvlies während des Einführungsvorganges. Die frei bewegliche Nukleinsäure bindet an der Glasvlies-Matrix. Im nächsten Schritt wird die im Formkörper (C) stehende Flüssigkeit nach unten abgesaugt. Dabei strömt die Flüssigkeit nochmals durch das Glasvlies und noch nicht gebundene Nukleinsäure wird an die Matrix fixiert.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10 Bauelement zum Verschließen des Probengefäßes A

11 Bauelement zum Ergreifen des Formkörpers C

C Formkörper

11 poröse Matrix

5 12 äußere Kontur

13 Mittel zur Fixierung des Formkörpers im Elutionsgefäß

14 Hohlkörper

15 Mittel zur Befestigung eines Deckels

16 innere Kontur

10 17 Mittel zur Fixierung eines Stempels E, umlaufend

18 umlaufender Steg, abbrechbar

19 Rand

D Elutionsgefäß

12 Einrastkerbe

15 **E Stempel**

10 Andruckfläche

11 Außenkontur

12 Innenraum

13 Öffnungen in der Andruckfläche

20 14 Entnahmeöffnung

15 Dichtung

16 Einrastring

17 Aussparung

25 **Patentansprüche**

1. Verfahren zur Bindung eines biologischen Materials an eine Festphase durch

- 30 - Bereitstellung einer das biologische Material enthaltenden Proberflüssigkeit in einem Probengefäß (A) mit einer inneren Kontur (A17) und
- Einbringen eines gegen das Probengefäß mit einer porösen Matrix (C11) verschlossenen, eine auf die innere Kontur (A17) abgestimmte Kontur (C12) aufweisenden und hohlen Formkörpers (C) in das Probengefäß (A), so daß Probenflüssigkeit durch die poröse Matrix (C11) in den Formkörper (C) eindringt.

35 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Formkörper (C) anschließend aus dem Probengefäß (A) entfernt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Matrix (C11) zur Bindung des biologischen Materials befähigt ist.

40 4. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Material eine Nukleinsäure ist.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die restliche Probenflüssigkeit vor Entfernen des Formkörpers (C) aus dem Probengefäß (A) abgesaugt wird.

45 6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Formkörper (C) anschließend in ein Gefäß (D) eingebracht wird, in dem das gebundene biologische Material freigesetzt wird.

50 7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Einbringen des Formkörpers (C) in das Probengefäß (A) mittels eines das Probengefäß (A) und den Formkörper (C) in Richtung auf die Umgebung aerosoldicht verschließenden Deckels (B) vorgenommen wird.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Kraft zur Lösung des Deckels (B) vom Probengefäß (A) geringer ist als die Kraft zur Lösung des Deckels (B) von dem Formkörper (C).

55 9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Formkörper Mittel (C12) zur Fixierung des Formkörpers (C) in dem Gefäß (D) aufweist, die bewirken, daß der Formkörper nur unter Zerstörung des Formkörpers (C) oder des Gefäßes (D) oder mit einer Kraft, die größer ist als die Kraft, die zur Lösung des Deckels (B) vom Formkörper (C) erforderlich ist, aus dem Gefäß (D) entfernt werden kann.

10. Hohler Formkörper, enthaltend eine zur Bindung eines biologischen Materials fähige poröse Matrix (C11) und Bauelemente (C13 und C15) zur Befestigung eines Deckels und eines den Formkörper zumindest teilweise umfassenden Gefäßes (D).

5 11. Formkörper nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er auf die für das Gefäß vorgesehene Seite hin mittels einer flüssigkeitsdurchlässigen porösen Matrix (C11) verschlossen ist.

12. Formkörper nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix (C11) mit Hilfe eines abbrechbaren umlaufenden Steges (C18) in dem Innenraum (C14) des Formkörpers fixiert ist.

10

13. Formkörper nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix (C11) komprimierbar ist.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

10. Hohler Formkörper, enthaltend eine zur Bindung eines biologischen Materials fähige poröse Matrix (C11) und Bauelemente (C13 und C15) zur Befestigung eines Deckels und eines den Formkörper zumindest teilweise umfassenden Gefäßes (D).

5 **11.** Formkörper nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er auf die für das Gefäß vorgesehene Seite hin mittels einer flüssigkeitsdurchlässigen porösen Matrix (C11) verschlossen ist.

12. Formkörper nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix (C11) mit Hilfe eines abbrechbaren umlaufenden Steges (C18) in dem Innenraum (C14) des Formkörpers fixiert ist.

10 **13.** Formkörper nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix (C11) komprimierbar ist.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

FIG 1

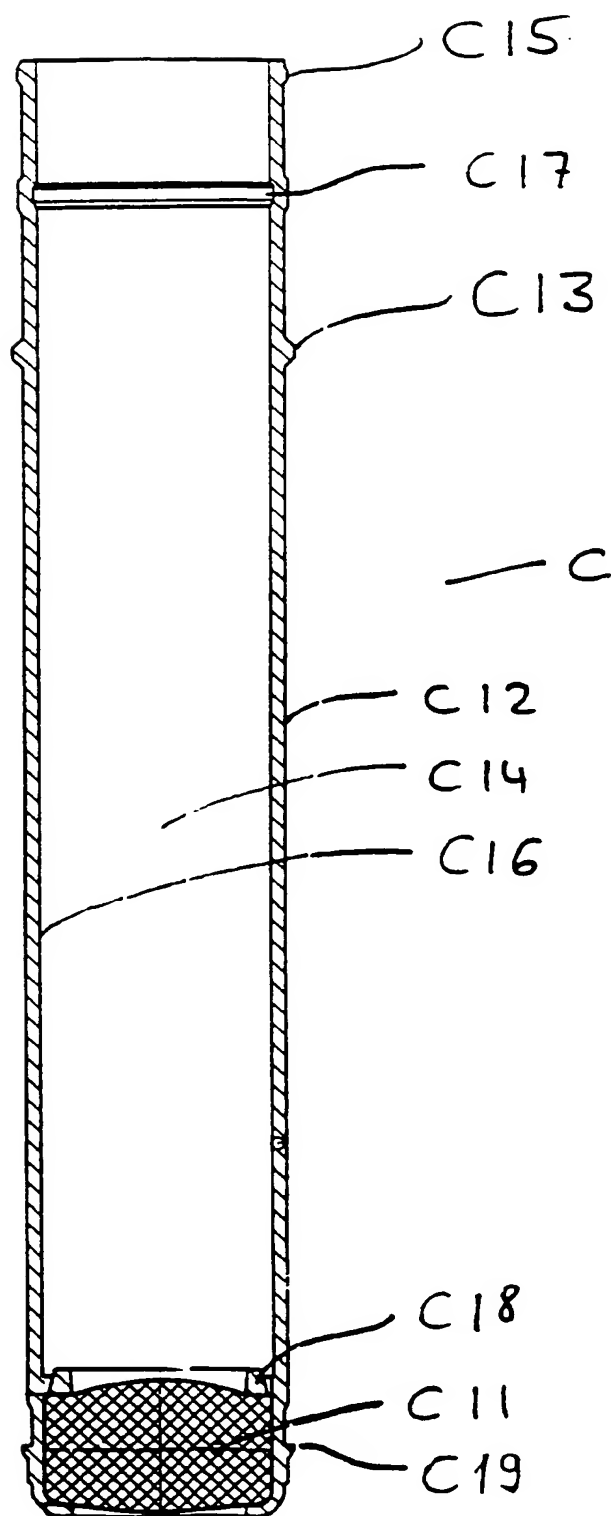
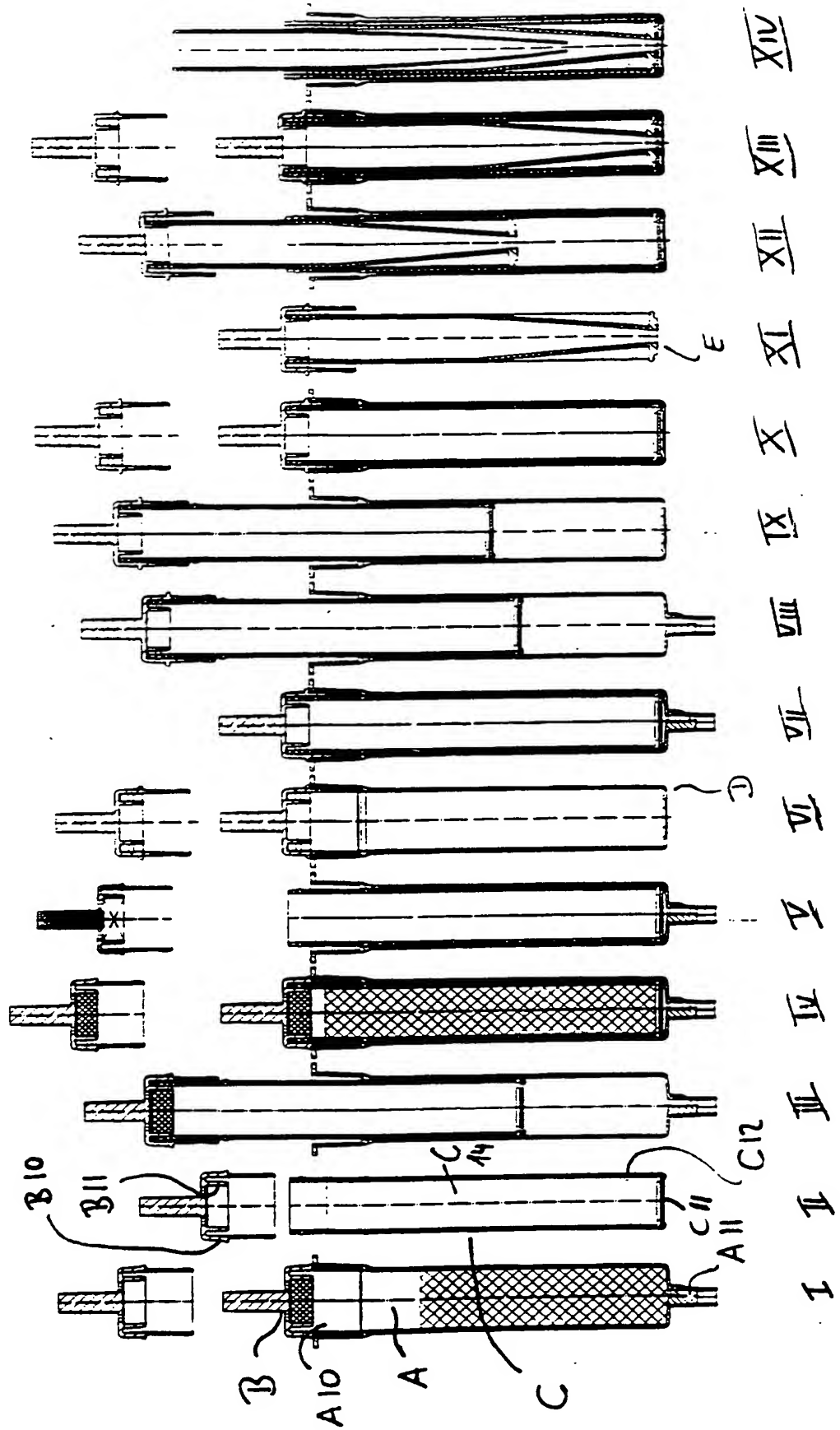


FIG 2





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 96 10 4920

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	EP-A-0 378 353 (CANCER DIAGNOSTICS INC) 18.Juli 1990	1-3,6	B01L3/14 G01N33/543
Y	* Spalte 4, Zeile 9 - Spalte 8, Zeile 30 *	7,8,10, 11	
Y	--- US-A-4 083 788 (FERRARA L T) 11.April 1978 * Spalte 2, Zeile 41 - Spalte 3, Zeile 16 *	7,8,10, 11	
A	--- US-A-5 124 041 (SHEER DONALD G ET AL) 23.Juni 1992 * Spalte 5, Zeile 26 - Spalte 6, Zeile 20 * Spalte 8, Zeile 32 - Zeile 47 *	4	
X	--- EP-A-0 508 010 (MINA LTD) 14.Oktober 1992 * das ganze Dokument *	1-3	
X	--- EP-A-0 294 645 (HOYER GMBH & CO) 14.Dezember 1988 * das ganze Dokument *	1,2	
A	-----	10,11,13	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			B01L G01N
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 3.Juli 1996	Prüfer Bindon, C
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 1503 03.92 (P/MC03)